

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



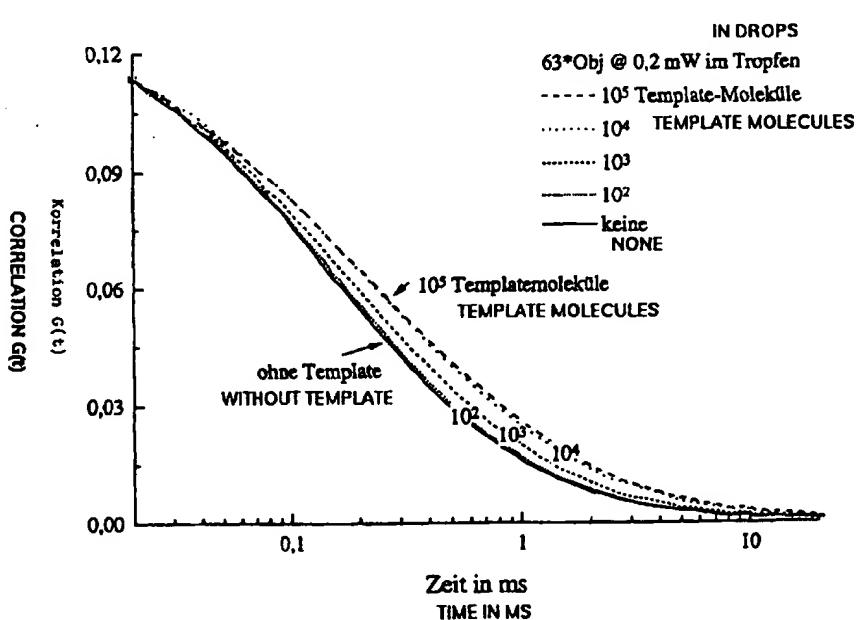
(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/21832  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Juni 1997 (19.06.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05472		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 6. December 1996 (06.12.96)		
(30) Prioritätsdaten: 195 45 965.2 8. December 1995 (08.12.95) DE 196 34 226.0 24. August 1996 (24.08.96) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529 Hamburg (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIGEN, Manfred [DE/DE]; Georg-Dehio-Weg 14, D-37075 Göttingen (DE). WALTER, Nils [DE/DE]; Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Am Faßberg, D-37077 Göttingen (DE). SCHWILLE, Petra [DE/DE]; Angerstrasse 12, D-37073 Göttingen (DE). OEHLENSCHLÄGER, Frank [DE/DE]; Baumschulweg 5, D-37083 Göttingen (DE).		
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		

(54) Title: PROCESS FOR DETERMINATION OF LOW CONCENTRATION OF NUCLEIC ACID MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREMOLEKÜLEN IN NIEDRIGER KONZENTRATION

(57) Abstract

The invention relates to a process for determination of a low concentration of nucleic acid molecules in samples to be examined, by amplification reactions using unmarked primers as amplification primers and detectable, in particular marked primers, as detection primers and in particular using polymerases and/or ligases. The detectable primers hybridise to the amplification products. The drop in the concentration of detectable, in particular, marked primers, and/or the rise in the concentration of amplification products is measured and is used to measure the presence of the nucleic acid molecules to be determined.



(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuremolekülen in niedriger Konzentration in zu untersuchenden Proben mittels Amplifikationsreaktionen unter Verwendung von unmarkierten Primern als Amplifikationsprimer und detektierbaren, insbesondere markierten Primern als Detektionsprimer sowie insbesondere von Polymerasen und/oder Ligasen, wobei die detektierbaren Primer an die Amplifikationsprodukte hybridisieren und die Abnahme der Konzentration der detektierbaren, insbesondere markierten Primer, und/oder die Zunahme der Konzentration der Amplifikationsprodukte gemessen wird und als Maß für das Vorhandensein der zu bestimmenden Nukleinsäuremoleküle herangezogen wird.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuremolekülen in niedriger Konzentration

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuremolekülen in niedriger Konzentration in zu untersuchenden Proben mittels Amplifikationsreaktionen, insbesondere unter Verwendung von Polymerasen und/oder Ligasen, sowie unmarkierten und detektierbaren Primern.

Ein derartiges Amplifikationsverfahren ist für die molekulare Diagnostik, insbesondere für die Pathogendiagnostik, von großer Bedeutung. Eine Vielzahl von Techniken ist beschrieben worden, die geringe Mengen an spezifischer Nukleinsäure nachzuweisen vermögen. Dem erfindungsgemäßen Verfahren ähnlich ist der 5'-Nuklease-Assay (die sogenannte TaqMan-Polymerase-Chain-Reaction; Livak et al. in PCR Methods and Applications 4 (1995), 357 - 361). Die Basis dieser Methode ist ein am 5'-Ende mit einem Reportermolekül (Fluorescein) und am 3'-Ende mit einem Quenchermolekül (Rhodamin) markiertes Oligonukleotid, welches am 3'-Ende zudem über einen Phosphatrest gegen eine enzymatische Kettenverlängerung geschützt ist. Im Verlauf der PCR-Reaktion wird die Sonde

von der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase erkannt, wenn sie downstream zu einer primer-gestarteten Polymerase-Reaktion an die zu amplifizierende Matrize hybridisiert hat. In der Folge sorgt die 5'-3'-Exonukleaseaktivität für die Hydrolyse des 5'-Endes der Sonde, wodurch die Fluoreszenz-Emission des Fluorescein-Reporters ansteigt, da sie nicht länger durch die Nachbarschaft des Rhodamins gelöscht wird. Gravierende Nachteile dieses Verfahrens sind die sehr aufwendige und kostenintensive Präparation der doppeltmarkierten und endgruppen geschützten Oligonukleotide, die Beteiligung der enzymatischen Hydrolyse und der Einfluß von Medieneffekten auf die Fluoreszenzausbeute, d.h. die Quantifizierbarkeit.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem besteht darin, ein universell einsetzbares, leicht handhabbares und preiswertes Verfahren zur qualitativen und quantitativen Detektion von kleinsten Mengen an Nukleinsäure bereitzustellen. Es ist hierbei insbesondere im Hinblick auf die Diagnostik infektiöser Pathogene wünschenswert, daß das gesamte Verfahren in Kompartimenten ablaufen kann, die nach der Zugabe der Probe verschlossen werden und im Laufe des Verfahrens nicht wieder geöffnet werden müssen.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Die Unteransprüche 2 bis 10 betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur Bestimmung von Nukleinsäuremolekülen in niedrigen Konzentrationen in zu untersuchenden Proben. Dabei werden Amplifikationsreaktionen eingesetzt. Diese verwenden insbesondere Polymerasen und/oder Ligasen. Es werden unmarkierte Amplifikationsprimer eingesetzt. Zudem werden detektierbare, insbesondere markierte Primer, sogenannte Detektionsprimer, verwendet. Die detektierbaren Primer hybridisieren an die Nukleinsäure

und/oder werden durch die Amplifikationsreaktion in die amplifizierte Nukleinsäure eingebaut, wobei die Konzentration der freien Detektionsprimer abnimmt. Die Abnahme dieser Konzentration und/oder die Zunahme der Konzentration der Amplifikationsprodukte wird gemessen und als Maß für das Vorhandensein des zu bestimmenden Nukleinsäuremoleküls herangezogen.

Vorzugsweise sind die detektierbaren Primer mit fluoreszierenden Gruppen markiert. Als Amplifikationsreaktionen kommen insbesondere Primer abhängige Reaktionen wie die Polymerasekettenreaktion (PCR), Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR), isothermale 3SR (self-sustained sequence replication), Strand Displacement Amplification (SDA) und/oder Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) in Betracht. Des Weiteren kann es bevorzugt sein, die Methode der Ligase Chain Reaction (LCR) einzusetzen. Ebenso kann die sogenannte gap-LCR (U. Landegren, Current Opinion in Biotechnology 1996, 7: 95 - 97) Verwendung finden.

Wird die Abnahme der Konzentration der detektierbaren, insbesondere markierten Primer, und/oder die Zunahme der Konzentration der Amplifikationsprodukte, wie erfindungsgemäß bevorzugt wird, mittels fluoreszenzmarkierter Primer gemessen, ist die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) einsetzbar, um ein Maß für das Vorhandensein des zu bestimmenden Nukleinsäuremoleküls zu ermitteln. Bei dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Amplifikationstechniken mit der Detektionsmethode Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie gekoppelt. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt somit die Realisierung einer Endpunkt titration, wobei die nachzuweisende Sequenz während der Reaktion stufenweise oder kontinuierlich amplifiziert wird. Der Endpunkt dieser als Endpunkt titration auffaßbaren Reaktion ist erreicht, wenn der erfindungsgemäß zu verwendende Detektionsprimer durch Inkorporation in die neue synthetisierte Nukleinsäure verbraucht ist, bzw. eine weitere

Abnahme der Konzentration des Detektionsprimers nicht mehr feststellbar ist oder einen vorher festlegbaren, zweckmäßigen Wert erreicht hat.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können unterschiedlich markierte Detektionsprimer verwendet werden. Die Detektion und Auswertung kann vorzugsweise mittels der FCS in Form der in der WO 94/16313 offenbarten Kreuzkorrelation durchgeführt werden.

Bei der Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer kann es in weiteren Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt sein, eine Variante der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie unter Ausnutzung von Prinzipien der Nahfeldmikroskopie (WO 96/13744) zu verwenden oder auf Analysemethoden gemäß der europäischen Patentanmeldung 96 116 373.0 zurückzugreifen. Die letztgenannte Anmeldung beschreibt eine Methode zur Analyse von Proben durch wiederholte Messung der Anzahl von Photonen pro definiertem Zeitintervall von Licht, welches von den Partikeln in der Probe emittiert, gestreut und/oder reflektiert wird, und Bestimmung der Verteilung der Anzahl von Photonen in den jeweiligen Zeitintervallen. Die Methode ist dadurch gekennzeichnet, daß die Verteilung der spezifischen Helligkeiten der Partikel aus der Verteilung der Anzahl von Photonen bestimmt wird.

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß eine Polymerase ohne 5'-3'-Exonukleaseaktivität verwendet. Andernfalls würde die Sonde wie im Ansatz gemäß Livak et al. abgebaut. Die Polymerasen sind kommerziell erhältlich.

Erfindungsgemäß ist es jedoch auch möglich, auf eine Extension des Detektionsprimers während des Verfahrens zu verzichten. Dies kann z.B. durch Verwendung eines Didesoxy-nukleotides am 3'-Ende des Detektionsprimers oder durch die Verwendung von markierten PNA als Detektionsprimern erfolgen. Erfindungsgemäß ist auch der Anstieg der Diffusionszeiten

des Detektionsprimers durch Hybridisierung an die amplifizierte Nukleinsäure ausreichend für eine reproduzierbare FCS-Detektion.

Die erfindungsgemäße Maßnahme, die Abnahme der Konzentration der detektierbaren, insbesondere markierten Primer, zu messen und als Maß für das Vorhandensein des zu bestimmenden Nukleinsäuremoleküls heranzuziehen, beruht auf der Tatsache, daß zu Beginn der Reaktion der Detektionsprimer sich in einem Zustand hoher Mobilität befindet, während er am Ende der Reaktion durch die Hybridisierung bzw. durch die Amplifikationsreaktion (Einbau in ein Amplifikationsprodukt) weitgehend bis vollständig in einen Zustand niedriger Mobilität überführt wird. Diese Mobilitätsänderung läßt sich in besonders geeigneter Weise durch die Methode der Fluoreszenz-korrelationsspektroskopie messen, wobei die Probe im geschlossenen Kompartiment verbleiben kann. Es kann erfindungsgemäß bevorzugt sein, die Konzentration des Detektionsprimers als gering im Verhältnis zur Konzentration des Amplifikationsprimers zu wählen. Insbesondere kann die Konzentration des Amplifikationsprimers das 5- bis 200-fache der Konzentration des Detektionsprimers betragen.

Aus der vorzugsweise mit der Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie ermittelten Korrelationskurve lassen sich sowohl die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle, das relative Verhältnis fluoreszenzmarkierter Moleküle unterschiedlicher Größe als auch ihre Diffusionsmobilitäten schnell und zuverlässig ermitteln. Das erfindungsgemäße Verfahren in Form einer Endpunkt titration und/oder Hybridisierung weist durch entsprechende Wahl und Konzentration der fluoreszenzmarkierten Primer nur die Anwesenheit der gesuchten Sequenz, welche eine zum Detektionsprimer komplementäre Sequenz aufweist, nach.

Das Verfahren ist unempfindlich gegenüber unspezifischen Amplifikationen. Eine hohe Konzentration an Amplifikations-

primer ist wünschenswert, um eine sichere Amplifikation auch geringer Mengen an nachzuweisenden Nukleinsäuren zu gewährleisten. So kann zum Beispiel die Konzentration des Amplifikationsprimers 0,5  $\mu\text{M}$  betragen, während der Detektionsprimer vorzugsweise in einer Konzentration von 1 bis 10 nM vorliegt. Aus der entsprechenden Wahl unterschiedlicher Konzentrationen für Amplifikationsprimer und Detektionsprimer ergeben sich insbesondere die folgenden Vorteile. Bei der Amplifikationsreaktion wie der PCR muß es zu Assoziationsreaktionen zwischen Primer und Template kommen, um die Primer-Elongation zu starten. Diese Reaktionen haben normalerweise Geschwindigkeitskonstanten von  $k_R = 10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Im Zeitbereich von Sekunden bis Minuten kommt es gemäß der Beziehung  $1/t = k_R (C_{\text{primer}} + C_{\text{template}})$  nennenswert zu Komplexbildungen, wenn einer der Partner im Bereich von 0,1 bis 1  $\mu\text{M}$  vorliegt. Dies gilt nur für bereits hohe Templatekonzentrationen bzw. für die Reaktion mit den Amplifikationsprimern. Erst wenn die Konzentration entsprechend hoch ist, kommt es zur gewünschten und spezifischen Hybridisierung mit dem Detektionsprimer, der sich dann in einer der erfindungsgemäßen Ausführungsformen in wenigen Amplifikationsschritten in gewünschter Weise verbraucht und nahezu vollständig durch Kettenverlängerung in Amplifikate überführt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere in Kombination mit Probenträgern wie z.B. Polycarbonat-Folien, welche sich durch folgende Vorzüge auszeichnen. Sie sind

- a) chemisch inert
- b) fest verschließbar (keine Kontaminationseffekte, keine Verdampfung)
- c) nicht fluoreszierend
- d) von relativ geringer Dicke (10 bis 20  $\mu\text{m}$  im Bereich der Probenflüssigkeit)
- e) von relativ hoher Wärmeleitung.

Bevorzugt lassen sich Folien mit 96 oder 384 Kompartimenten

verwenden. Die Folien werden mit Testflüssigkeit und Probenflüssigkeit in ca. 5 bis 20  $\mu$ l Portionen gefüllt und verschlossen. Die Lösungen werden als kleine Tropfen durch Kapillarkräfte im oberen Teil der Folie fixiert, in der das Kompartiment eine für die FCS-Methode erforderliche Wandstärke von 10 bis 20  $\mu$ m besitzt. Die Folien lassen sich in einen thermostatisierbaren Rahmen einpassen. Sie werden mit einer dünnen Schicht Immersionsflüssigkeit für das im FCS-Detektionsverfahren zu verwendende Objektiv benetzt. Die Kompartimente lassen sich insbesondere für Verdünnungsreihen, Screenings oder auch für unterschiedliche Testtypen einsetzen. Die typische Meßzeit für eine Folie mit 96 Kompartimenten liegt im Bereich weniger Minuten bis maximal einer halben Stunde. Durch Mitführung geeigneter Standardverdünnungen des Templates in der gleichen Folie ist die Quantifizierung der zu detektierenden Nukleinsäure in den Testkompartimenten möglich.

Die quantitative Bestimmung der zu detektierenden Nukleinsäure kann erfindungsgemäß durch Verwendung von mindestens zwei Amplifikationsansätzen der Probe erfolgen. Hierzu wird bevorzugt eine Verdünnungsreihe des ersten Amplifikationsansatzes hergestellt. Aus dem Verdünnungsverhältnis ergeben sich die relativen Konzentrationen des zweiten und ggf. weiterer Amplifikationsansätze. Bei Kenntnis der Nachweiskonzentration, d. h. der Detektionsschwelle des verwendeten Detektionssystems, oder eines sonstigen zweckmäßigen Schwellenwertes ist durch Bestimmung der Reaktionszeiten bzw. der Anzahl der Amplifikationszyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertes in den jeweiligen Amplifikationsansätzen eine Quantifizierung der nachzuweisenden Nukleinsäure möglich. Der Schwellenwert sollte bevorzugt innerhalb der logarithmischen Amplifikationsphase erreicht werden, um eine hohe Quantifizierungsgenauigkeit zu erzielen. In vorteilhafter Weise wirken sich bei der erfindungsgemäßen Quantifizierung Unterschiede in der Ampifikationseffizienz, die z. B. in der besonderen Struktur der nachzuweisenden Nukleinsäure

begründet sein können, nicht auf das Meßergebnis aus.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich bei Verwendung geeigneter Detektionsprimer auch zum Nachweis von Punktmutationen, Translokationen, Deletionen oder Haplotyp-Differenzierung. Es ist zudem im Sinne einer Multiplex-PCR einsetzbar. Bei erblichen Stoffwechselkrankheiten, wie z.B. der autosomal rezessiven zystischen Fibrose, lassen sich durch Verwendung zweier Detektionsprimer mit unterschiedlichen Farbstoffmarkern heterozygote Patienten von homozygoten Patienten unterscheiden. Es ist zudem sowohl zum Nachweis von DNA- als auch RNA-Genomen geeignet (letzteres z.B. durch Einsatz in einer RT-PCR oder 3SR-Reaktion).

Die Figur 1 betrifft eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung der PCR.

Die Figur 2 beschreibt die Verschiebung der Korrelationskurve  $G(t)$  bei Anwesenheit der angegebenen initialen Template-Mengen.

Die Figur 3 betrifft die Darstellung der invertierten Korrelationsfunktion in der Form  $(G(t=0)-1)/(G(t)-1)$ .

Die Figur 4a zeigt die im Ausführungsbeispiel 1 durch FCS-Analyse erhaltenen Autokorrelationsfunktionen  $G(t)$ .

Die Figur 4b zeigt die Auftragung dieser Daten in linearisierte Form.

Die Figur 5 verdeutlicht die Änderung der relativen Diffusionszeiten des Detektionsprimers im Verlauf der Amplifikationsreaktion gemäß Ausführungsbeispiel 1.

Die Figuren 6a und b verdeutlichen das Detektionslimit des erfindungsgemäßen Verfahrens bei Anwendung auf das Ausführungsbeispiel 1.

- 9 -

Die Figur 7 zeigt den erfindungsgemäßen Einsatz eines Detektionsprimers während der NASBA im Ausführungsbeispiel 2.

Die Figur 8 zeigt die Lokalisation der verwendeten Primer innerhalb der gag Region des HIV-1 Genomes.

Die Figur 9 zeigt einen typischen Zeitverlauf der Verschiebung der Korrelationskurven aufgrund der Hybridisierung und Extension des Detektionsprimers im Ausführungsbeispiel 2.

Die Figur 10 verdeutlicht die Kinetik der Hybridisierungs/Extensionsreaktion des Detektionsprimers im Ausführungsbeispiel 2.

Die Figur 1 beschreibt schematisch das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung der PCR. Die in der PCR verwendeten Amplifikationsprimer p1 und p2 sind als Pfeile dargestellt, der Detektionsprimer p3 ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Kreis) gekoppelt. Der linke Teil der Figur zeigt amplifizierte Artefakte bei Abwesenheit des Templates. Hierbei kann es sich z.B. um Primerdimere der hochkonzentrierten Primer p1 und p2 handeln. Die rechte Seite der Figur zeigt p2 in Anwesenheit des Templates. Erst wenn die Amplifikate in genügend hoher Konzentration vorliegen, wirkt das Amplifikat als Template für den niedrigkonzentrierten, fluoreszenzmarkierten Detektionsprimer. Die Mobilitätsänderung des Primers lässt sich deutlich durch eine Verschiebung der Korrelationskurve erkennen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzielte Ergebnisse an *Mycobacterium tuberculosis* sind in den Figuren 2 und 3 dargestellt. Der Nachweis dieses pathogenen Erregers dauerte bislang aufgrund der aufwendigen Zellkulturverfahren ca. 3 bis 4 Wochen. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens lässt sich diese Nachweiszeit stark verkürzen.

In der Figur 2 wird die Verschiebung der Korrelationskurve  $G(t)$  bei Anwesenheit der angegebenen initialen Template-Mengen gezeigt. Die jeweils angegebene Anzahl von Template-molekülen wurde zu Beginn der Reaktion in jeweils 50  $\mu$ l Reaktionsansatz vorgelegt, durch das erfindungsgemäße Verfahren in 32 PCR-Zyklen amplifiziert und mittels der FCS-Methode analysiert. Es wurde ein für den Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis* charakteristisches Template verwendet. Die Detektionsgrenze lag hier bei 100 Template-molekülen pro Ansatz. Das Verfahren ist damit empfindlich genug, um in jeder molekulardiagnostischen Anwendung eingesetzt zu werden.

Die Figur 3 zeigt die Auftragung der invertierten Korrelationsfunktion in der Form  $(G(t=0)-1)/((G(t)-1)$ . In dieser Darstellung wurden die gleichen Daten wie in Figur 2 verwendet. Durch die invertierte Auftragung sind die Kurven im betrachteten Zeitbereich linearisiert, wodurch ihre Interpretation erleichtert wird. Eine Verschiebung von  $G(t)$  entlang der t-Achse zeigt sich in dieser Darstellung als Abflachung der Steigung, die durch lineare Regression in einfacher Weise erhalten werden kann. Die Detektionsgrenze lässt sich deutlich als 100 Templatemoleküle pro Reaktions-ansatz erkennen.

Die Figur 4a zeigt die durch FCS-Analyse erhaltenen Auto-korrelationsfunktionen  $G(t)$  mit zunehmender Anzahl an PCR-Zyklen der für *Mycobacterium tuberculosis* und *M. bovis* spezifischen Targetsequenz *IS6110* (Ausführungsbeispiel 1). Die PCR-Amplifikation eines 106 bp-Segmentes, ausgehend von  $10^5$  Strängen der genomischen *Mycobacterium tuberculosis* DNA vor einem Hintergrund von 2.5  $\mu$ g unspezifischer humaner Placenta-DNA in 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen, erfolgte unter Verwendung des Primerpaars S1/S2 als Amplifikationsprimer und 10 nM TMR-markierter Sonde PR1 als Detektionsprimer (Tabelle 1). Der Detektionsprimer bindet zwischen den Amplifikationsprimern mit derselben Orientierung wie der Amplifi-

kationsprimer S2 und überlappt mit dem 3'-Ende von S2 um fünf Nukleotide. Die Amplifikationsreaktionen wurden nach einer unterschiedlichen Zahl an Zyklen gestoppt. Die Inkorporation des Detektionsprimers in die Amplifikate ist an der Verschiebung der Autokorrelationskurve zu längeren Korrelationszeiten, welche einer Zunahme der Diffusionszeit des Detektionsprimers entspricht, deutlich erkennbar.

Die Figur 4b zeigt die Auftragung der Daten in der linearisierten Form  $[G(t=0)] / [G(t)]$ . Mit zunehmender Amplifikation ist eine Abnahme der Geradensteigung zu beobachten.

Die Figur 5 verdeutlicht die Änderung der relativen Diffusionszeiten des Detektionsprimers im Verlauf der Amplifikationsreaktion. Die Diffusionszeiten des Detektionsprimers spiegeln eindeutig die PCR-Amplifikationskinetik mit einer vor Erreichen des Detektionsgrenzwertes initialen lag-Phase, schneller exponentieller Anreicherung der Amplifikationsprodukte sowie einer Plateauphase wider. Dieses Plateau zeigt eine Sättigung an, welche dem Endpunkt einer Titration vergleichbar ist. Die abnehmende Anzahl der durchschnittlich sich im Laserfokus befindlichen Moleküle des Detektionsprimers mit zunehmender Zahl der Temperaturzyklen ist vermutlich auf Adsorptionseffekte an den Wänden der Reaktionsgefäße zurückzuführen (Nebenbild der Figur 5). Zudem ist eine scheinbare Zunahme emittierter Photonen pro Molekül und Sekunde zu beobachten (Nebenbild der Figur 5).

Die Figuren 6a und 6b verdeutlichen das Detektionslimit des erfindungsgemäßen Verfahrens bei Anwendung auf das Ausführungsbeispiel 1. Die PCR-Amplifikationsreaktionen wurden unter Verwendung unterschiedlicher Amplifikations- und Detektionsprimer durchgeführt (Tabelle 1). Vor einem Hintergrund von 2.5  $\mu$ g unspezifischer humaner Plazenta-DNA in 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen wurde eine konstante Anzahl an PCR-Zyklen (entweder 36 oder 40 Zyklen) mit jeweils unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Targetgenomen durchgeführt. Bei

Verwendung der Amplifikationsprimer S1/S2 mit 1 nM Detektionsprimer PR1 (Figur 6a) oder der Amplifikationsprimer B1B/B2B mit 5 nM Detektionsprimer PR3 (Figur 6b) liegt das Detektionslimit unterhalb von 100 *Mycobacterium tuberculosis* Genomen. Eine Quantifizierung von bis zu lediglich 10 Targetgenomen kann durch Vergleich mit einem Verdünnungsstandard erfolgen. Die mittels FCS bestimmten Diffusionszeiten des Detektionsprimers stimmen gut mit den Ergebnissen der dem Fachmann in bekannter Weise durchgeführten Sequenzanalyse überein (Figur 6a). Nichtbindende Sonden, wie z.B. der Primer HS3, zeigen bei Amplifikation der Targetsequenz keine Veränderung der Autokorrelationsfunktion bzw. ihrer Diffusionzeiten (Figur 6b).

Die Figur 7 zeigt den erfindungsgemäßen Einsatz eines Detektionsprimers während der Amplifikationsreaktion gemäß Ausführungsbeispiel 2. Die von van Genem et al. (PCR Methods and applications 4, 177-184, 1995) beschriebene NASBA-Methode wurde erfindungsgemäß folgendermaßen variiert:

1. Ein Detektionsprimer (gag1) wurde dem Reaktionsansatz zugesetzt. Dieser hybridisierte an einer spezifischen Sequenz des 145 b RNA-Stranges. Durch Reverse Transkription mittels AMV-RT entstand ein ds DNA-Molekül mit 130 bp, während das unter Verwendung der Primer 1 und 2 entstandene Amplifikationsprodukt 167 bp aufwies.
2. Alle Komponenten der NASBA-Reaktion einschließlich des Detektionsprimers und der Enzyme wurden auf Eis gemischt; der in der Literatur beschriebene Denaturierungsschritt konnte ohne Einfluß auf Reaktionsspezifität entfallen.
3. In Standard-NASBA-Verfahren wird die amplifizierte RNA mittels Hybridisierungstechniken wie ELGA (enzyme-linked gel assay) und ECL (Elektrochemilumineszenz) detektiert und quantifiziert. Diese Techniken erfordern die Öffnung der Probenträger mit der Gefahr von carryover-Kontaminationen.

Durch die Verwendung von FCS als Detektionsmethode ist es erfindungsgemäß in vorteilhafter Weise möglich, die Probenlösung ohne Öffnung der Probenträger zu analysieren.

Die Figur 8 zeigt die Lokalisation der verwendeten Primer innerhalb der gag Region des HIV-1-Genomes.

Die Figur 9 zeigt einen typischen Zeitverlauf der Verschiebung der Korrelationskurven (— 10 min, . . . . . 20 min, . . . . . 35 min, . . . . . 50 min, --- 60 min nach Beginn der Amplifikation) aufgrund der Hybridisierung sowie Extension des Detektionsprimers. Die Anfangskonzentration der HIV-1 RNA-Moleküle betrug 5000 pro ml Plasma. Hinsichtlich der theoretischen Beschreibung der Autokorrelationskurven eines Zweikomponentensystems wird auf das Ausführungsbeispiel 1 verwiesen. Im vorliegenden Beispiel wurden der hybridisierte (gag1-145 b RNA) Detektionsprimer und die durch Extension entstandene 130 bp-Komponenten aufgrund ihrer annähernd gleichen Diffusionszeiten als eine Komponente behandelt. Zur Bestimmung der Kinetik der hybridisierten/extendierten Detektionsprimers wurden die Korrelationskurven unter Verwendung der dem Fachmann bekannten Gleichung zur Beschreibung der Autokorrelationsfunktion eines Zweikomponentensystems gefittet.

Die Figur 10 verdeutlicht die Kinetik der Hybridisierungs-/Extensionsreaktion des Detektionsprimers. Die Bedeutung der verwendeten Symbole ist wie folgt:

- negative Kontrolle; ○ falsch-positive Probe; ■ Anfangskonzentration von 1000 HIV-1 RNA-Molekülen pro ml Plasma;
- Anfangskonzentration von 2000 HIV-1 RNA-Molekülen pro ml Plasma; ▽ Anfangskonzentration von 5000 HIV-1 RNA-Molekülen pro ml Plasma; ▲ Anfangskonzentration von 20000 HIV-1 RNA-Molekülen pro ml Plasma. Bei geringer Anfangskonzentration ist die Kurve zu längeren Inkubationszeiten verschoben. Bei

einer mit wenigen Molekülen kontaminierten falsch-positiven Probe ist diese Verschiebung besonders auffällig, so daß eine klare Unterscheidung zwischen falsch-positiven und positiven Proben möglich ist.

Der Wert der initialen Konzentration an HIV-1 RNA Molekülen erlaubt eine Unterscheidung zwischen positiven und falsch-positiven Proben. Die direkte quantitative Analyse der Anfangskonzentration an RNA-Molekülen in einer Probe kann erfindungsgemäß wie folgt ermittelt werden. Die Zeitabhängigkeit der Konzentration der Amplifikationsprodukte in einer NASBA-Reaktion ist annähernd durch folgende Exponentialfunktion beschreibbar:  $P(t) = P_0 \exp(kt)$ , wobei  $k$  eine für den Amplifikationsmechanismus repräsentative Konstante darstellt. Der Logarithmus der in der Probe enthaltenen Moleküle stellt eine lineare Funktion der zur Erzielung eines bestimmten Primerbindungsgrades notwendigen Inkubationszeit dar (Nebenbild der Figur 10). Mittels einer Verdünnungsreihe lässt sich somit die Anfangskonzentration an RNA-Molekülen ermitteln.

Im vorliegenden Ausführungsbeispiel wurde der kombinierte Ansatz aus Hybridisierung und Extension des Detektionsprimer dargestellt. Die mittels der FCS erhaltenen Daten wurden durch Sequenzierung konfirmiert. Es konnte bei mehr als 50 durchgeföhrten Analysen keine unspezifische Bindung des Detektionsprimers festgestellt werden, so daß sich hiermit die Möglichkeit ergibt, auf eine Extension des Detektionsprimers während der Analysen zu verzichten. Dies kann z.B. durch Verwendung eines Didesoxynucleotides am 3'-Ende des Detektionsprimers oder durch Verwendung von PNA-Primern erfolgen. Erfindungsgemäß ist auch der Anstieg der Diffusionszeiten des Detektionsprimers durch Hybridisierung an die amplifizierte RNA ausreichend für eine reproduzierbare FCS-Detektion.

Ausführungsbeispiel 1

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Amplifikationsmethode die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einer auf der Methode der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) beruhenden Detektionstechnik unter Verwendung eines mit fluoreszierenden Gruppen markierten Detektionsprimers, wie z.B. einem N,N,N',N'-tetramethyl-5-carboxyrhodamin (TMR)-markierten Detektionsprimer, kombiniert. Die Detektionsprimer werden durch die Amplifikationsreaktion in die amplifizierte Nukleinsäure eingebaut, wobei der Einbau mit einer Zunahme der Diffusionszeit des Detektionsprimers einhergeht, welche mittels FCS beobachtet werden kann.

Verwendete Materialien: Die Oligodesoxynukleotide (Tabelle 1) wurden in HPLC-reiner Qualität bei der Fa. NAPS (D-Göttingen) erworben. Die Markierung der Sonden PR1, PR3, HS1 und HS3 erfolgte mit dem 5'-Isomer von TMR an ihrem 5'-Ende über einen Aminohexylllinker. Die Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung der Absorption des TMR-Labels bei 260 nm (mit  $A_{260} / A_{554} = 0.49$ ) bestimmt, und der Substitutionsgrad (DOS), entsprechend einem Markierungslabel pro Molekül, wurde mittels folgender Formel bestätigt:

DOS = [ (10 x N / 86) x  $A_{554}$  ] / [  $A_{260} - (0,49 \times A_{554})$  ] , wobei N die Anzahl der Basen in der Probe angibt.

2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate (dNTPs) wurden von der Fa. Pharmacia erworben; das 5'-3'-exonukleasefreie Stoffel-fragment der *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase von der Fa. Perkin-Elmer. Die humane Placenta DNA wurde bei der Fa. Sigma erworben. Zudem wurde genomische DNA von *Mycobacterium tuberculosis* verwendet.

PCR in Gegenwart von Detektionsprimer: Die Amplifikationsreaktion erfolgte entweder in 50 µl oder 25 µl Proben mit

10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml Gelatine, jeweils 0.5  $\mu$ M der beiden Amplifikationsprimer, jeweils 200  $\mu$ M der vier dNTPs, 50 ng/ $\mu$ l humaner Placenta-DNA als Überschuß unspezifischer DNA, 1 bis 20 nM des TMR-markierten Detektionsprimers, und 0.05 U/ $\mu$ l des 5'-3'-exo-nukleasefreien Stoffelfragmente der *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase. Die Menge an genomischer *Mycobacterium tuberculosis* DNA (im Bereich von 0 bis 10<sup>6</sup> Moleküle je 50  $\mu$ l der Reaktionsmischung) betrug wie angegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte in Reaktionsröhren (Multiple-Safecap tubes) der Fa. Sarstedt. Es wurde folgendes Temperaturprogramm in einem TRIO-Thermoblock-Cycler der Fa. Biometra (Göttingen) angewendet: Denaturierung bei 94°C für 30 s, Primerbindung bei 56°C (Primerpaar S1/S2) oder 60°C (Primerpaar B1B/B2B) für 20 s, und Elongation bei 72°C für 30 s, jeweils für die angegebene Zahl der Zyklen.

FCS-Messung und Bestimmung relativer Diffusionszeiten: Im Anschluß an die PCR wurden 10  $\mu$ l der Reaktionsmischung mittels FCS unter Verwendung eines 63x1.2 Wasser-Immersionsobjektives untersucht. Eine detaillierte Beschreibung der FCS ist in dem Artikel von Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5740-5747) zu finden. Die Autokorrelationsfunktion für eine Mischung von Partikeln mit schnellen und langsamen Translationsdiffusionszeiten ist bei Thompson (Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. I, Lakowicz, JR (ed), Plenum 1991) beschrieben.

#### Ausführungsbeispiel 2

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die isothermale Amplifikationsmethode NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) mit der Detektionsmethode FCS kombiniert. Das erfindungsgemäße Verfahren wird in diesem Ausführungsbeispiel verwendet, um eine simulierte HIV-Infektion nachzuweisen.

Verwendete Materialien: Die Komponenten für die RNA-Isolierung sowie für die Amplifikationsmethode NASBA wurden bei der Fa. Organon Teknica (Eppelheim) erworben. Der mit TMR-markierte Detektionsprimer gag1 wurde von der Fa. NAPS (Göttingen) synthetisiert. Die Probenträger mit 96 Reaktionskompartimenten wurden in der Feinmechanikwerkstatt des Max-Planck-Institutes für Biophysikalische Chemie angefertigt; jedes Kompartiment besitzt ein Volumen von 40  $\mu$ l und eine Wandstärke von 40  $\mu$ m. Das verwendete Plasma war Hepatitis B- und C-, CMV- und HIV-1-negativ.

Simulation einer HIV-1-Infektion: Jeweils 1 ml Plasma wurde mit unterschiedlichen Mengen (1000, 2000, 5000, 20000 Moleküle) an genomischer HIV-1 RNA (HXB2) versetzt. 9 ml Lyse-Puffer (5.25 M Guanidinthiocyanat, 50 mM Tris pH 6.4, 20 mM EDTA, 1.3 % w/v Triton X-100) wurden zugesetzt.

Isolierung von Nukleinsäuren aus dem Plasma: Die Nukleinsäuren wurden an aktivierte Kieselerde (50  $\mu$ l Suspension, 1 mg/ml), welche der Lyse-Mischung zugesetzt wurde, gebunden. Nach einem Wasch- und Trocknungsschritt wurden die Nukleinsäuren mit 50  $\mu$ l Elutionspuffer (1 mM Tris pH 8.5) eluiert und bei -70°C gelagert.

NASBA-Amplifikation der isolierten HIV-1 RNA: Typische Reaktionen wurden durchgeführt in einem 20  $\mu$ l Reaktionsvolumen, enthaltend 40 mM Tris pH 8.5, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 42 mM KCl, 5 mM DTT, 15 % v/v DMSO, jeweils 1mM dNTP, jeweils 2mM NTP, 0.1 U RNase H, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 40 U T7 RNA-Polymerase, 8 U AMV Reverse Transkriptase, 0.2  $\mu$ M Primer 1,2 und 5  $\mu$ l isolierte Nukleinsäure (enthaltend 100, 200, 500, 2000 HIV-1 RNA-Moleküle). In negativen Kontrollreaktionen wurden diese 5  $\mu$ l isolierter Nukleinsäure durch 5  $\mu$ l bidestilliertes Wasser ersetzt. Die Sequenzen der Amplifikationsprimer sind innerhalb der gag Region des HIV-1-Genomes lokalisiert (Figur 8). Sie weisen die folgenden Sequenzen auf:

Primer 1: 5'- AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC  
TTC CCC TTG GTT CTC TCA -3' (antisense NT 1471-1499  
von HXB2, T7 Promotor unterstrichen)

Primer 2: 5'- AGT GGG GGG ACA TCA AGC AGC CAT GCA AA - 3' (sense  
NT 1358-1386 von HXB2).

Zum Reaktionsansatz wurden 1  $\mu$ l TMR-markierter gag1-  
Detektionsprimer (Endkonzentration: 4.5 nM) zugesetzt:

gag1: 5'- TMR-GAG ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GAT -  
3' (sense NT 1395-1427 von HXB2)

Diese Amplifikationsansätze von jeweils 21  $\mu$ l wurden in ver-  
schließbare Probenträger, insbesondere Polycarbonatfolien  
mit 96 Vertiefungen, überführt und in die auf 42°C vor-  
temperierte Temperierungseinheit eines dem Fachmann bekannten  
FCS-Gerätes eingesetzt. In einem typischen Experiment wurden  
10 Amplifikationsreaktionen einschließlich negativer Kon-  
trollen in parallelisierter Form durchgeführt. Die FCS-  
online-Detektion erfolgte unter Verwendung eines Wasser-  
Immersionsobjektives (Zeiss Plan Neofluar 40x0.9). Das durch  
den Laserstrahl und ein Pinhole in einer dem Fachmann be-  
kannten Weise definierte Detektionsvolumen lag in der Größen-  
ordnung von  $10^{-15}$  l.

Table 1. Amplifikations- und Detektionsprimer für die DNA-Amplifikation von *IS6110* mittels PCR.

Oligodeoxynukleotid	Sequenz (5'→3') <sup>a</sup>	Lokalis. auf <i>IS6110</i> <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>
S1	accgcatcgaatgcattgtctcggtAAGGCGTACTCGACC	970-984	41.7
S2	cgattccgcgtccagacttcggGTGTACTGAGATCCCT	1025-1011	39.3
B1B	AGCGCCGCTTCGGAC	769-783	55.1
B2B	TCGATGTGTACTGAGATCCCT	1032-1011	54.7
PR1	TMR-CCCCTATCCGTATGGTGG	1015-998	52.0
PR3	TMR-CCCCTATCCGTATGGTGGATAACGTCTTC	1015-986	66.4
HS1	TMR-gacatgtcgicggccgc	-	-
HS3	TMR-tgcttagagatctctaagttataacacatcaatgtcaa	-	-

<sup>a</sup> Kleinbuchstaben = Zur Targetsequenz *IS6110* nicht komplementäre Basen.

<sup>b</sup> Bindungsstelle auf der Targetsequenz *IS6110*.

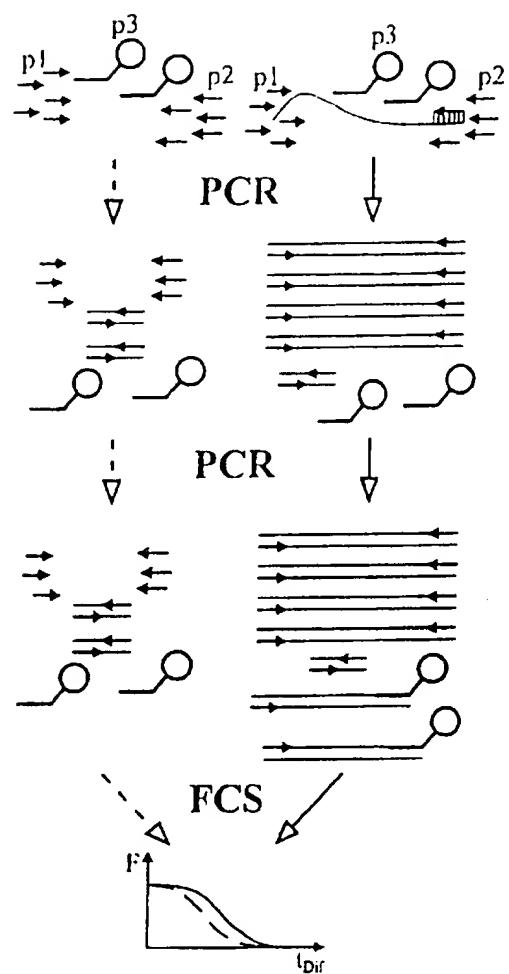
<sup>c</sup> Schmelzpunkt der jeweiligen Targetsequenz bei Konzentrationen von 1 nM DNA und 50 mM Salz.

A n s p r ü c h e

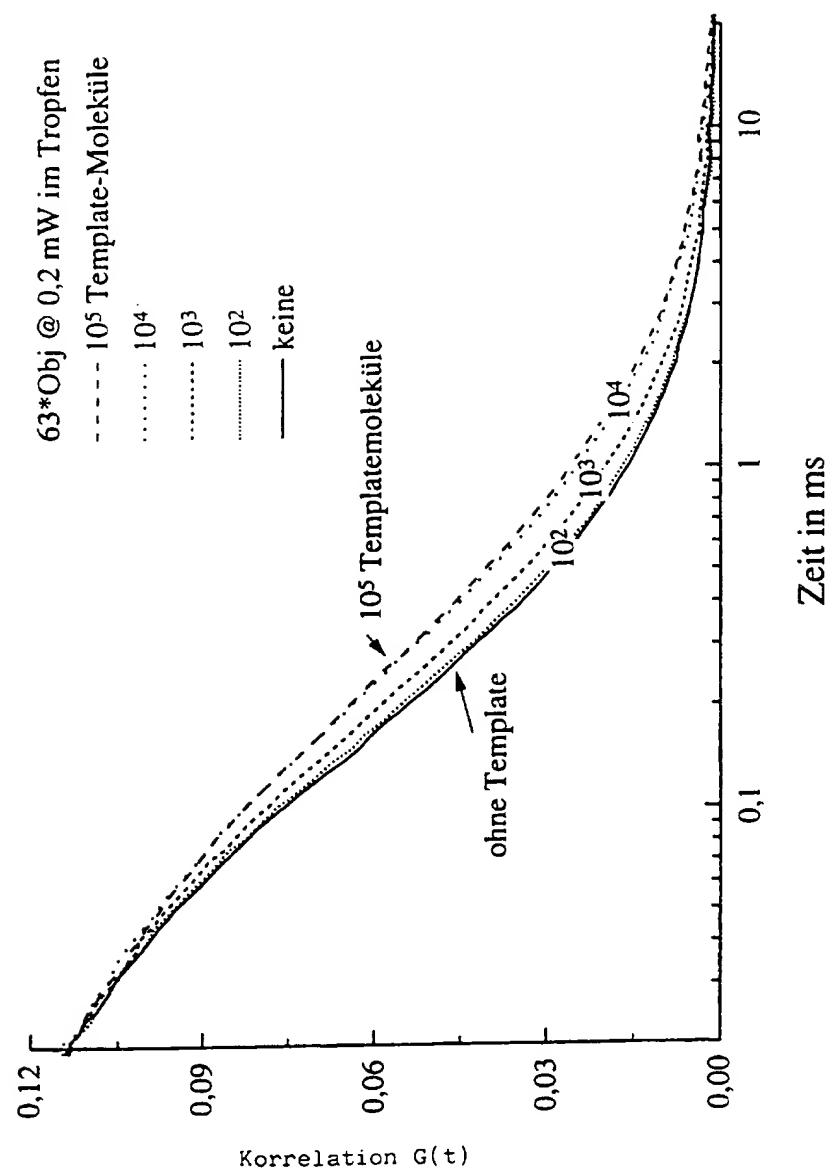
1. Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuremolekülen in niedriger Konzentration in zu untersuchenden Proben mittels Amplifikationsreaktionen unter Verwendung von unmarkierten Primern als Amplifikationsprimer und detektierbaren, insbesondere markierten Primern als Detektionsprimer sowie insbesondere von Polymerasen und/oder Ligasen, wobei die detektierbaren Primer an die Amplifikationsprodukte hybridisieren und die Abnahme der Konzentration der detektierbaren, insbesondere markierten Primer, und/oder die Zunahme der Konzentration der Amplifikationsprodukte gemessen wird und als Maß für das Vorhandensein der zu bestimmenden Nukleinsäuremoleküle herangezogen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die an die Amplifikationsprodukte hybridisierten detektierbaren, insbesondere markierten Primer, durch die Amplifikationsreaktion in die amplifizierte Nukleinsäure eingebaut werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die detektierbaren, insbesondere markierten Primer, Nukleinsäuren mit einem 3'-terminalen Didesoxynucleotid oder PNA sind.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die detektierbaren, insbesondere markierten Primer, mit fluoreszierenden Gruppen markiert sind.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei als Amplifikationsreaktion primerabhängige Reaktionen wie Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), isothermale 3 SR (self-sustained-sequence-replication), Strand-Displacement-Amplification (SDA), Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) und/oder Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) eingesetzt werden.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei als Amplifikationsreaktion die Ligase-Chain-Reaction oder gap-Ligase-Chain-Reaction eingesetzt wird.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Abnahme der Konzentration der detektierbaren, insbesondere markierten Primer, und/oder die Zunahme der Konzentration der Amplifikationsprodukte mittels Fluoreszenzspektroskopie, insbesondere Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), gemessen wird.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerase keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität aufweist.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Detektionsprimers gering im Verhältnis zur Konzentration des Amplifikationsprimers ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Amplifikationsprimers das 5- bis 200-fache der Konzentration des Detektionsprimers beträgt.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren mittels Probenträgern, insbesondere Polycarbonat-Folien, durchgeführt wird.
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der nachzuweisenden Nukleinsäuremoleküle bestimmt wird.

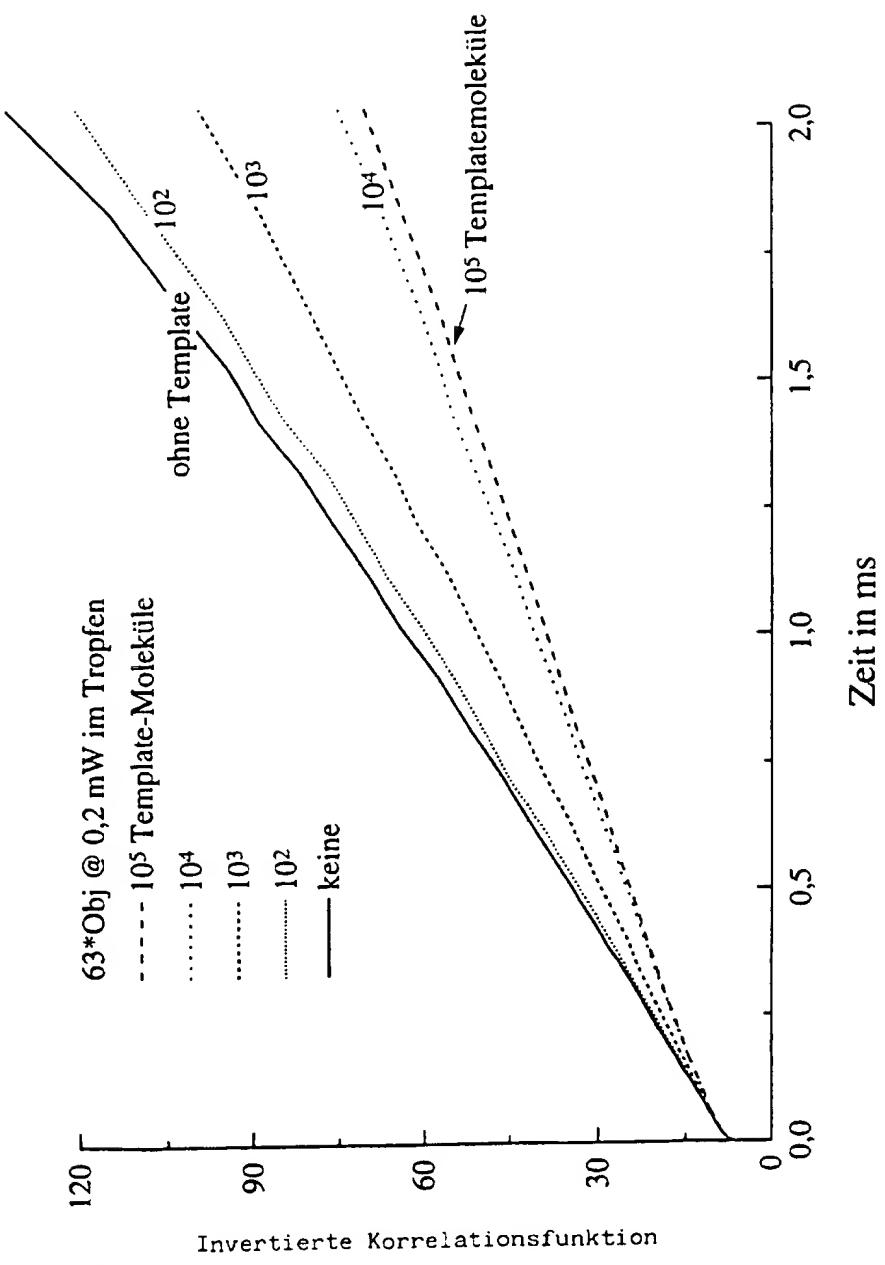
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Quantifizierung der nachzuweisenden Nukleinsäuremoleküle über eine Verdünnungsreihe bestehend aus mindestens zwei Amplifikationsansätzen erfolgt, indem die Reaktionszeit und/oder die Anzahl der Amplifikationszyklen bis zum Erreichen eines zweckmäßigen Schwellenwertes, welcher insbesondere innerhalb der logarithmischen Amplifikationsphase erreicht wird, ermittelt wird.

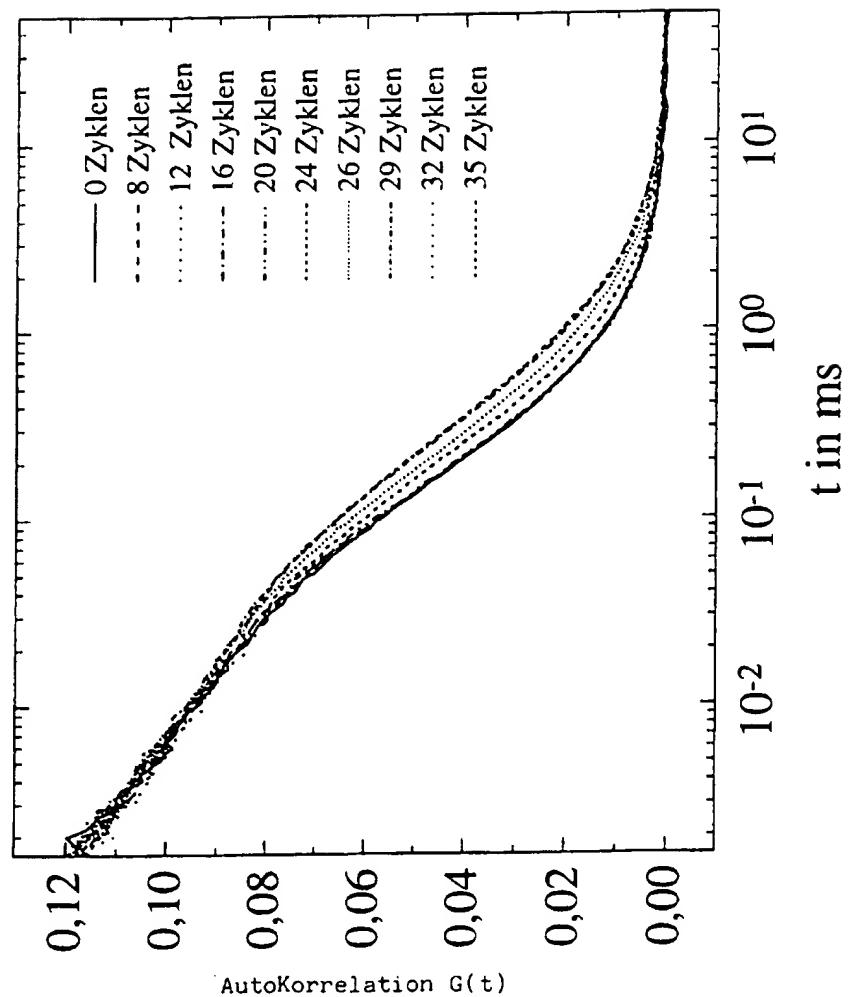


Figur 1

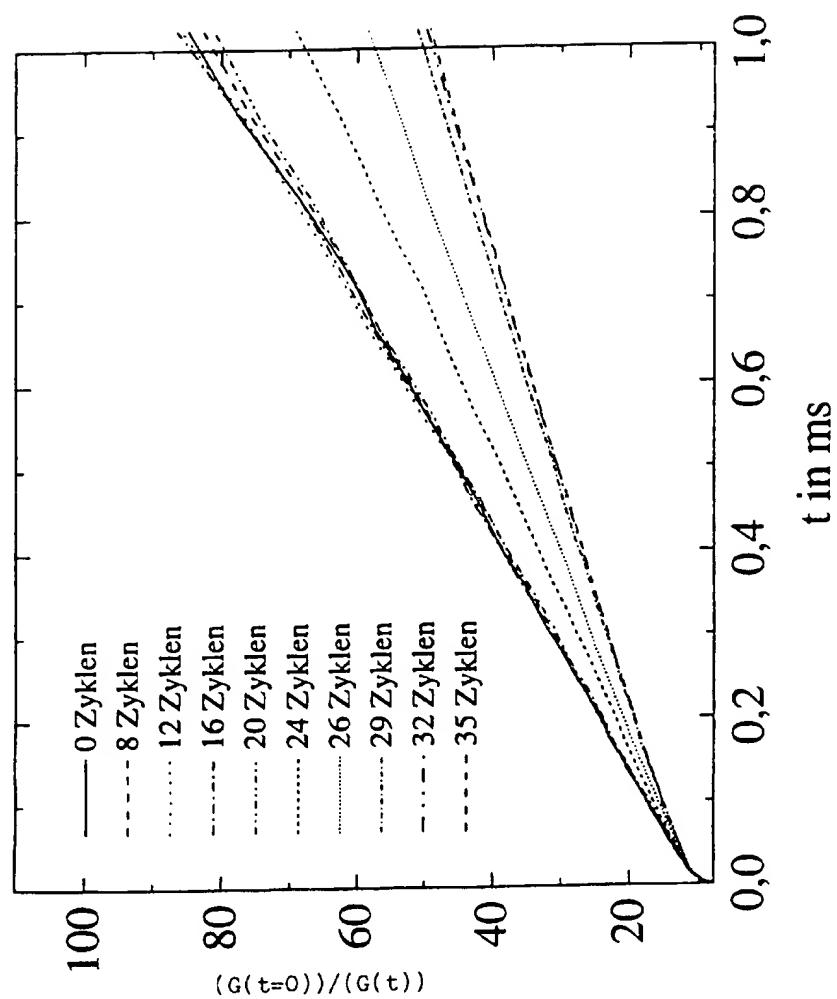


Figur 2

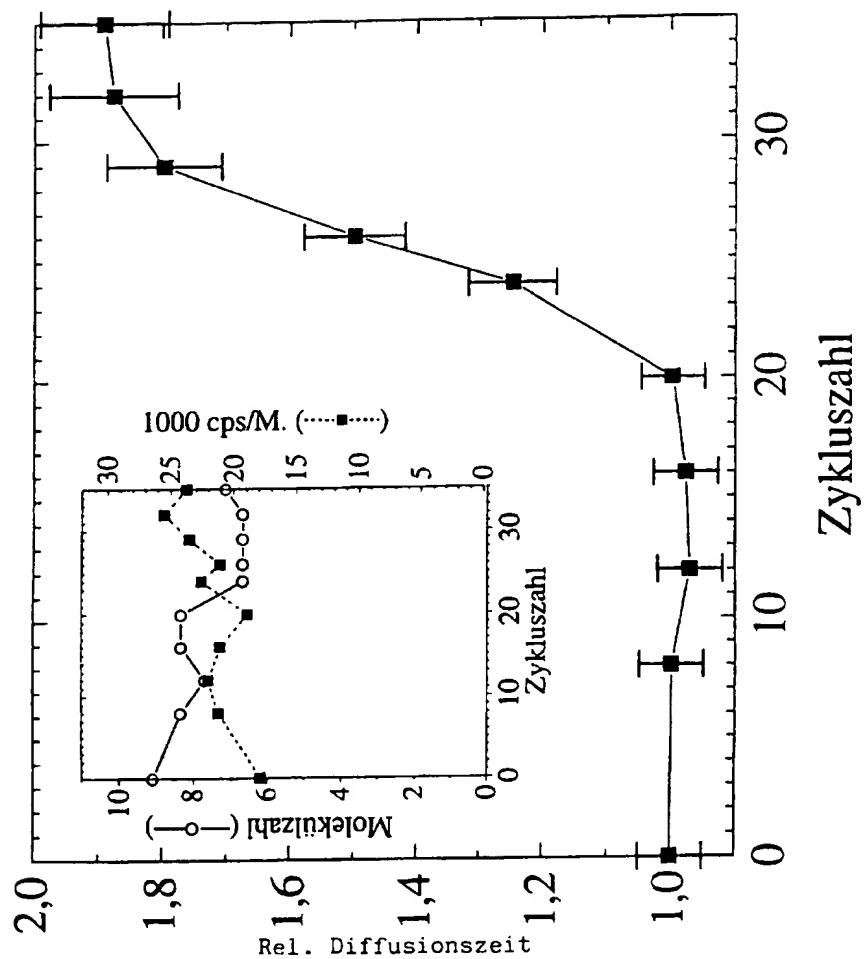




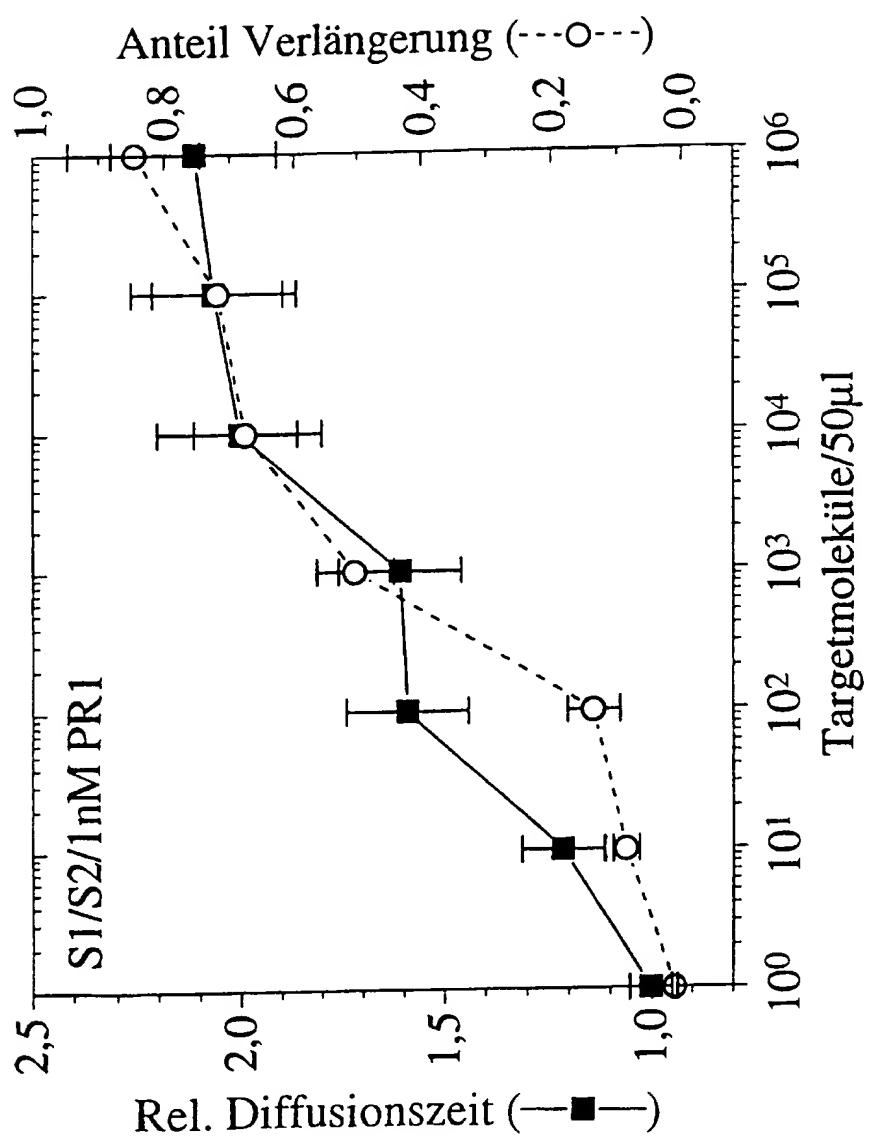
Figur 4a



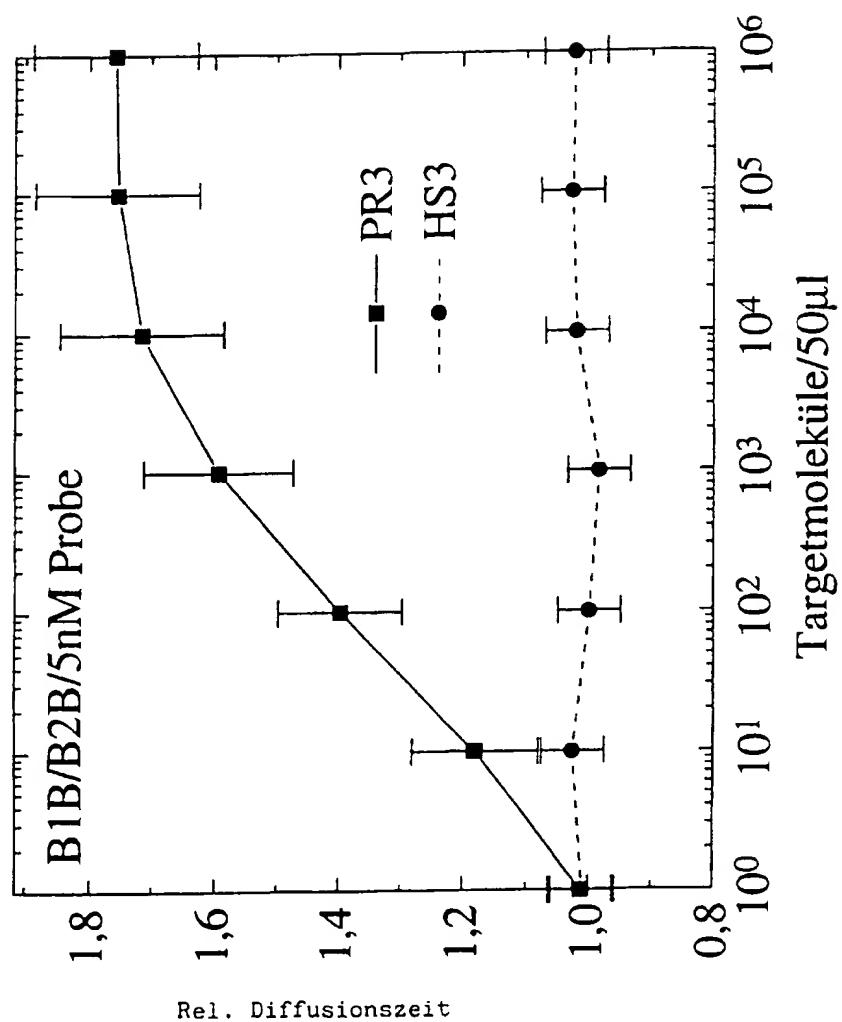
Figur 4b



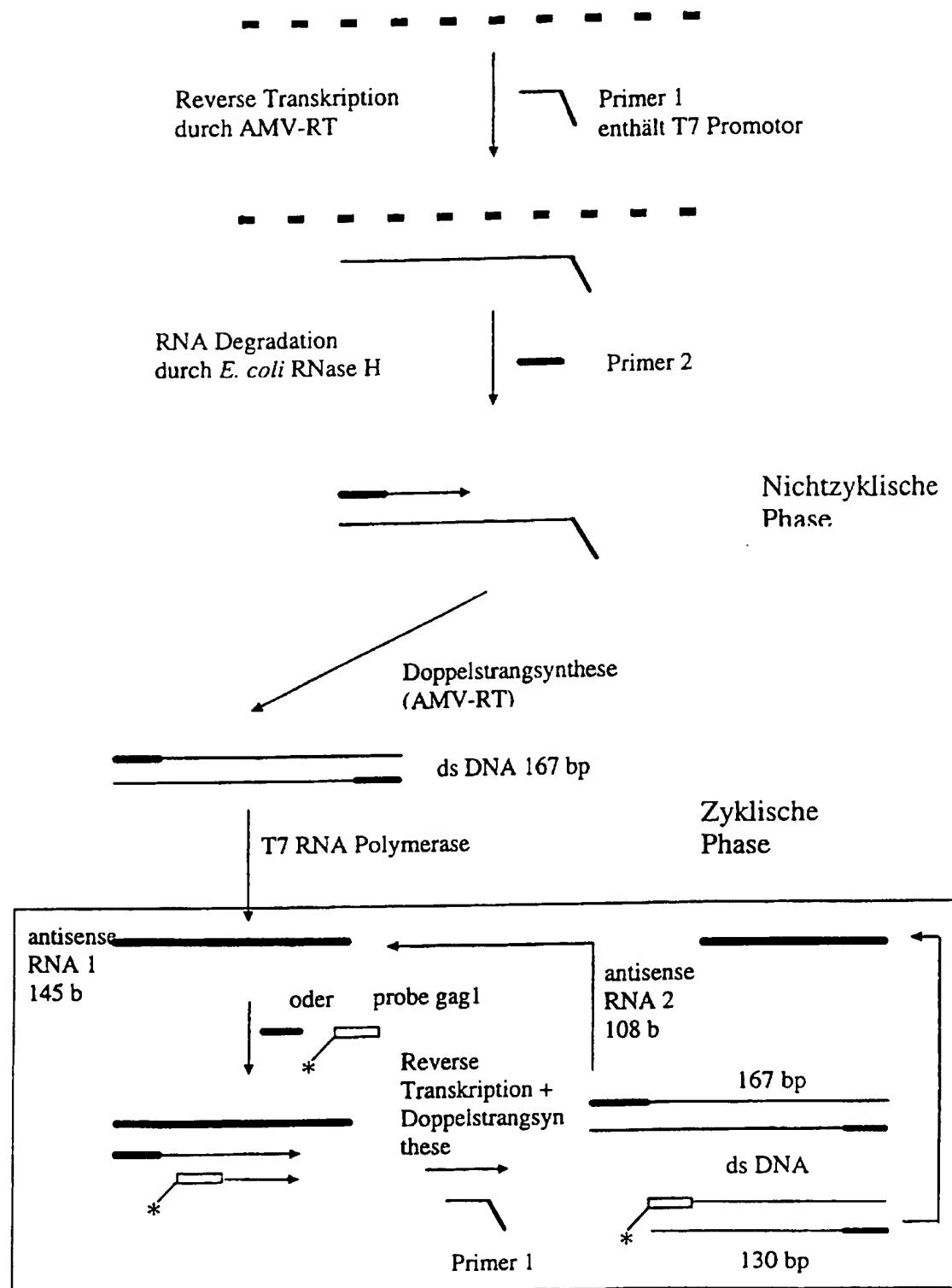
Figur 5



Figur 6a



Figur 6b

HIV-1 RNA Target ( $\approx$  9.2 kb)

Figur 7

1261 TAGTAGAAGA GAAGGCTTTC AGCCCAGAAG TGATACCCAT GTTTTCAGCA TTATCAGAAG

Primer 2

1321 GAGCCACCCC ACAAGATTAA AACACCATGC TAAACACAGT GGGGGGACAT CAAGCAGCCA

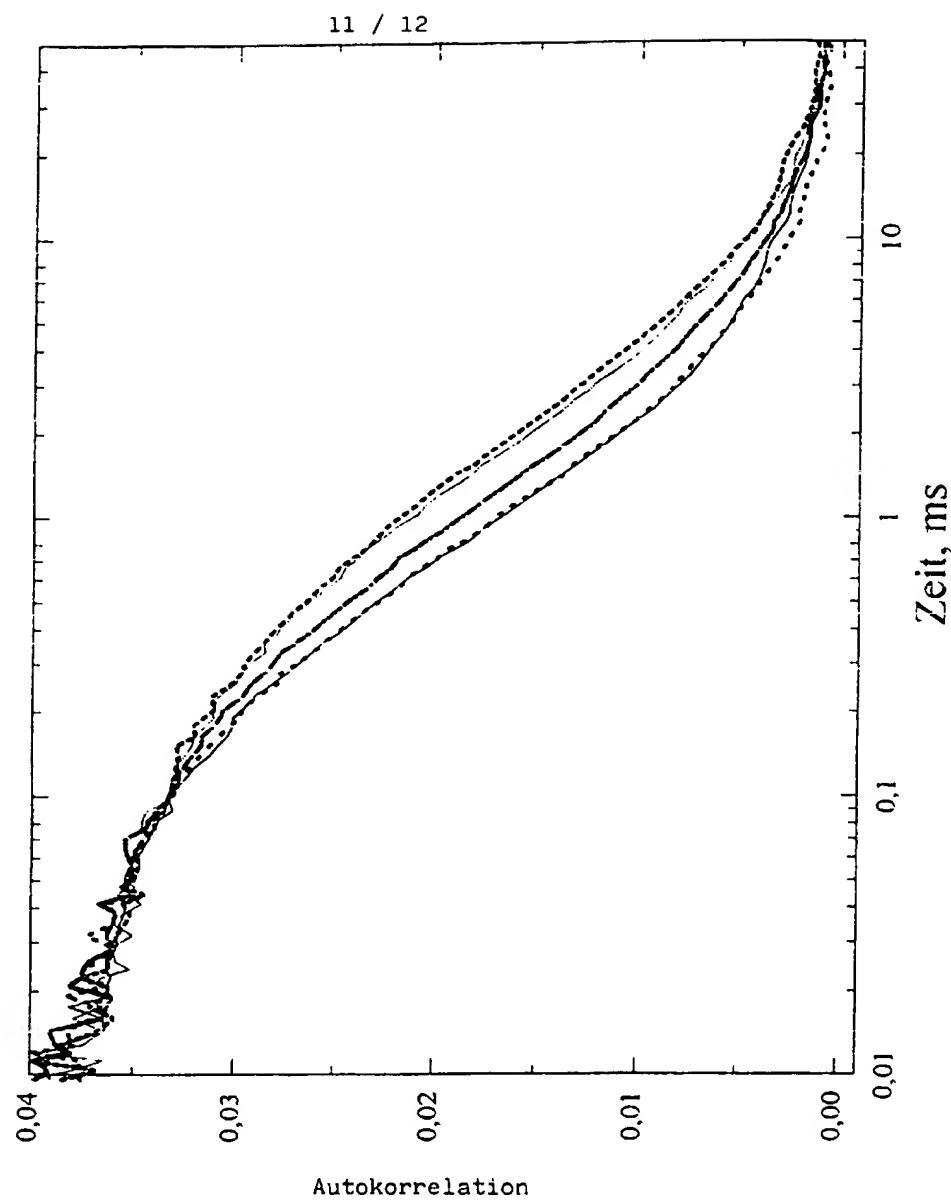
1381 TGCAAATGTT AAAAGAGACC ATCAATGAGG AAGCTGCAGA ATGGGATAGA GTGCATCCAG

1441 TGCATGCAGG GCCTATTGCA CCAGGCCAGA TGAGAGAACC AAGGGGAAGT GACATAGCAG

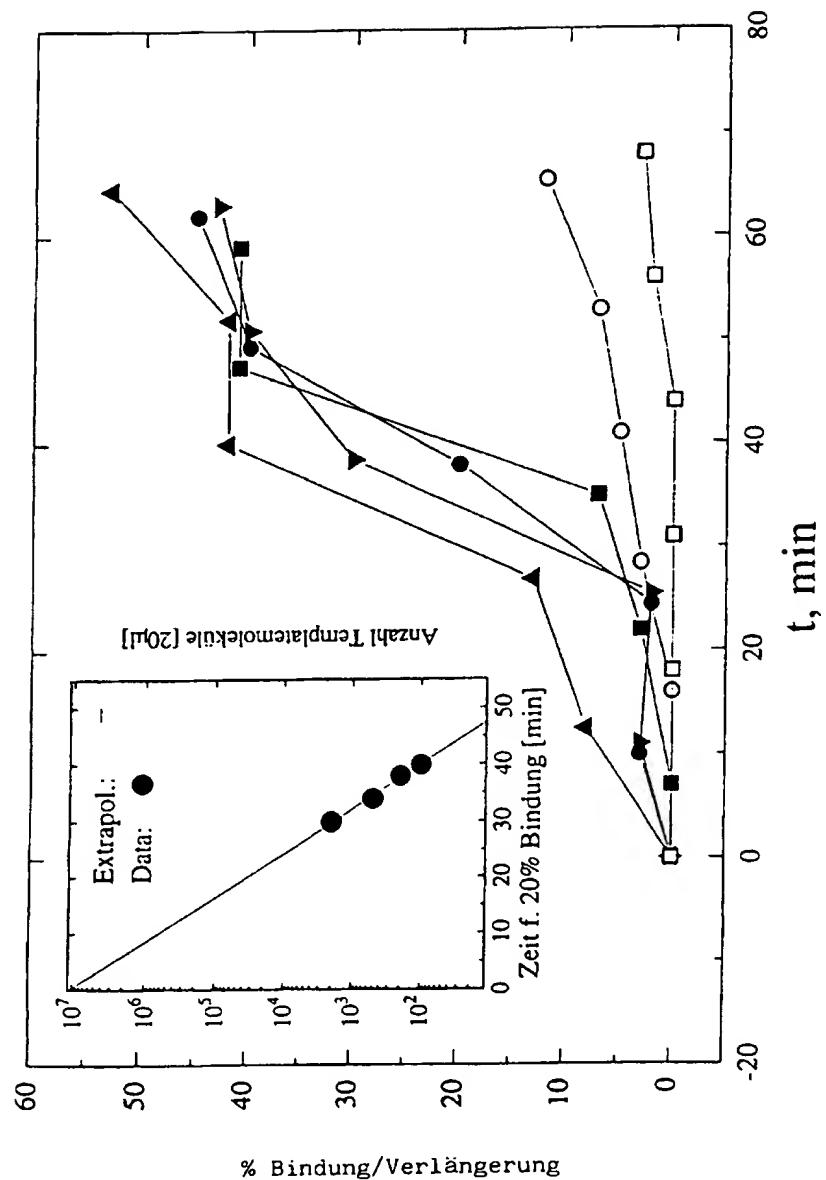
Primer

1501 GAACTACTAG TACCCCTTCAG GAACAAATAG GATGGATGAC AAATAATCCA CCTATCCCAG

Figur 8



Figur 9



Figur 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No  
PCT/EP 96/05472

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 10, 25 May 1995, pages 1795-99, XP002029411 KINJO M ET AL: "Ultrasensitive hybridization using fluorescence correlation spectroscopy" see the whole document ---	1
A	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, June 1994, pages 5740-47, XP002029412 EIGEN M ET AL: "Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology" see line 1, paragraph 7 - line 4 ---	1 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*'E' earlier document but published on or after the international filing date
- \*'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*'&' document member of the same patent family

1 Date of the actual completion of the international search  21 April 1997	Date of mailing of the international search report  14.05.97
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer  Osborne, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/05472

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 0 731 173 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 11 September 1996 see claims 1-13 ---	1-13
P,X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 93, November 1996, pages 12805-810, XP002029413 WALTER N ET AL: "Fluorescence correlation analysis of probe diffusion simplifies pathogen detection by PCR" see the whole document ---	1-13
P,X	EP 0 714 986 A (TOSOH CORP) 5 June 1996 see the whole document ---	1,4
X	EP 0 639 647 A (TANABE SEIYAKU CO ;EIKEN CHEMICAL (JP)) 22 February 1995 see the whole document ---	1,2,4
X	EP 0 678 581 A (BECTON DICKINSON CO) 25 October 1995 see the whole document ---	1,2,4
X	WO 93 10267 A (IGEN INC) 27 May 1993 see the whole document ---	1
A	WO 94 02634 A (UNIV SOUTH AUSTRALIA ;ADELAIDE CHILDREN S HOSPITAL (AU); HARRIS RA) 3 February 1994 -----	1,3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/05472

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0731173 A	11-09-96	DE 19508366 A JP 8242858 A	12-09-96 24-09-96
EP 0714986 A	05-06-96	JP 8211050 A	20-08-96
EP 0639647 A	22-02-95	JP 7023800 A	27-01-95
EP 0678581 A	25-10-95	US 5547861 A US 5593867 A AU 1502395 A BR 9501583 A CA 2145576 A CA 2145719 A EP 0678582 A JP 7289299 A JP 8038199 A AU 1501995 A	20-08-96 14-01-97 26-10-95 14-11-95 19-10-95 19-10-95 25-10-95 07-11-95 13-02-96 18-04-96
WO 9310267 A	27-05-93	AU 658962 B AU 3141293 A CA 2100159 A EP 0567635 A JP 6507316 T ZA 9208839 A	04-05-95 15-06-93 16-05-93 03-11-93 25-08-94 13-05-93
WO 9402634 A	03-02-94	AU 4551193 A CA 2140877 A EP 0656068 A	14-02-94 03-02-94 07-06-95

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 96/05472

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräststoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräststoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 10, 25. Mai 1995, Seiten 1795-99, XP002029411 KINJO M ET AL: "Ultrasensitive hybridization using fluorescence correlation spectroscopy" siehe das ganze Dokument ---	1
A	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 91, Juni 1994, Seiten 5740-47, XP002029412 EIGEN M ET AL: "Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology" siehe Zeile 1, Absatz 7 - Zeile 4 ---	1 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21. April 1997

14.05.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05472

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EP 0 731 173 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 11.September 1996 siehe Ansprüche 1-13 ---	1-13
P,X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 93, November 1996, Seiten 12805-810, XP002029413 WALTER N ET AL: "Fluorescence correlation analysis of probe diffusion simplifies pathogen detection by PCR" siehe das ganze Dokument ---	1-13
P,X	EP 0 714 986 A (TOSOH CORP) 5.Juni 1996 siehe das ganze Dokument ---	1,4
X	EP 0 639 647 A (TANABE SEIYAKU CO ;EIKEN CHEMICAL (JP)) 22.Februar 1995 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4
X	EP 0 678 581 A (BECTON DICKINSON CO) 25.Okttober 1995 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4
X	WO 93 10267 A (IGEN INC) 27.Mai 1993 siehe das ganze Dokument ---	1
A	WO 94 02634 A (UNIV SOUTH AUSTRALIA ;ADELAIDE CHILDREN S HOSPITAL (AU); HARRIS RA) 3.Februar 1994 -----	1,3

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05472

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0731173 A	11-09-96	DE 19508366 A JP 8242858 A	12-09-96 24-09-96
EP 0714986 A	05-06-96	JP 8211050 A	20-08-96
EP 0639647 A	22-02-95	JP 7023800 A	27-01-95
EP 0678581 A	25-10-95	US 5547861 A US 5593867 A AU 1502395 A BR 9501583 A CA 2145576 A CA 2145719 A EP 0678582 A JP 7289299 A JP 8038199 A AU 1501995 A	20-08-96 14-01-97 26-10-95 14-11-95 19-10-95 19-10-95 25-10-95 07-11-95 13-02-96 18-04-96
WO 9310267 A	27-05-93	AU 658962 B AU 3141293 A CA 2100159 A EP 0567635 A JP 6507316 T ZA 9208839 A	04-05-95 15-06-93 16-05-93 03-11-93 25-08-94 13-05-93
WO 9402634 A	03-02-94	AU 4551193 A CA 2140877 A EP 0656068 A	14-02-94 03-02-94 07-06-95

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**